



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

ÉVELYN TAIZE BARRILLI

**METABOLISMO DE MONOSSACARÍDEOS DE BIOMASSA ALGAL
POR LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ALGA VERDE**

**CHAPECÓ
2019**

ÉVELYN TAIZE BARRILLI

**METABOLISMO DE MONOSSACARÍDEOS DE BIOMASSA ALGAL
POR LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ALGA VERDE**

Trabalho de Conclusão do curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da
Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior

CHAPECÓ

2019

EVELYN TAIZE BARRILLI

**METABOLISMO DE MONOSSACARÍDEOS DE BIOMASSA
ALGAL POR LINILAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ALGA
VERDE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito
para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da
Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: **Prof. Sergio Luiz Alvez Junior**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e
aprovado pela banca em: 02 / 12 / 2019

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sergio Luiz Alvez Junior - UFFS



Profa. Dr. Guilherme Martinez Mibielli- UFFS



Prof. Dr. João Paulo Bender - UFFS

METABOLISMO DE MONOSSACARÍDEOS DE BIOMASSA ALGAL POR LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ALGA VERDE

Barrilli, E. T.*¹, Alves, S. L. Jr.¹

¹Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS - *Campus* Chapecó - Santa Catarina

*evelyntaize07@gmail.com

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol combustível, com um volume anual de aproximadamente 30 bilhões de litros. Esse expressivo volume de produção é majoritariamente decorrente da fermentação alcoólica do caldo e/ou do melaço de cana-de-açúcar, um processo já plenamente estabelecido, consagrado e otimizado, chamado de etanol de primeira geração (1G). Na busca de novas alternativas para produção de etanol, visando garantir uma alternativa às culturas alimentares e diminuir a pegada hídrica, encontram-se em desenvolvimento os processos de segunda e terceira geração do combustível. A produção de etanol 2G ocorre a partir de biomassa vegetal residual e já vêm sendo bastante estudado. O etanol 3G, que provém de biomassa de algas, carece de estudos principalmente na etapa fermentativa, haja vista a variabilidade de carboidratos presentes nos hidrolisados de algas e a ausência de microrganismos aptos a metabolizá-los. Assim sendo, o presente trabalho, num primeiro momento, se propôs a analisar cinco linhagens de leveduras isoladas de alga verde em decomposição em meios de cultivo contendo isoladamente os principais monossacarídeos oriundos da hidrólise de biomassas algais: glicose, manose, xilose e galactose. Posteriormente, seguindo delineamento experimental de Plackett & Burman (P&B), essas cinco cepas selvagens de leveduras e mais duas linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidas a cultivos com mistura de açúcares, no intuito de analisar a influência de múltiplas variáveis (pH, temperatura, concentração de NaCl e concentração dos açúcares redutores glicose, manose, xilose, galactose e ramnose) sobre o processo fermentativo. Todas as linhagens selvagens de leveduras foram capazes de metabolizar os açúcares separadamente, consumindo-os parcial ou totalmente após 24 h. Também foi verificada a produção de etanol por todas as linhagens cultivadas em glicose e manose, com ênfase para os 3,7 g.L⁻¹ produzidos pela CHAP-130 a partir de manose, além de 0,65 g.L⁻¹ a partir de galactose. No planejamento P&B, que continha diferentes proporções de mistura de açúcares, destacou-se o desempenho superior das cepas selvagens CHAP-154 e CHAP-155 em relação às linhagens industriais na condição dos pontos centrais, com produção de 3,2 e 4,4 g.L⁻¹ de etanol e consumo de 33 e 40% de açúcares redutores totais, respectivamente. Ademais, as leveduras isoladas de macroalgas também demonstraram tolerância ao NaCl e a altas temperaturas. Assim sendo, os dados obtidos sugerem que as linhagens analisadas podem contribuir para a otimização da produção de etanol de terceira geração.

Palavras-chave: Etanol 3G, Fermentação, Plackett & Burman, Manose, Galactose.

ABSTRACT

Brazil is the world's second largest producer of fuel ethanol, with an annual volume of approximately 30 billion liters. This expressive production volume is mainly due to the

alcoholic fermentation of sugarcane juice and/or molasses, a process that is already fully established, consecrated and optimized, called first-generation ethanol (1G). In the search for new alternatives for ethanol production, aiming to guarantee an alternative to food crops and reduce the water footprint, the second- and third-generation fuel processes are under development. The 2G-ethanol production occurs from residual plant biomass and has been widely studied. 3G ethanol, which comes from algae biomass, needs to be studied mainly in the fermentation stage, given the variability of carbohydrates present in algae hydrolysates and the absence of microorganisms able to metabolize them. Thus, firstly, the present study aimed to analyze five yeast strains isolated from decaying green algae in culture media containing the main monosaccharides found on algal biomass hydrolysates: glucose, mannose, xylose and galactose. Subsequently, following a Plackett & Burman (P&B) experimental design, these five wild yeast strains and two *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains were subjected to sugar-mixed cultures in order to analyze the influence of multiple variables (pH, temperature, NaCl concentration and concentration of the reducing sugars glucose, mannose, xylose, galactose and rhamnose) on the fermentation process. All wild yeast strains were able to metabolize the analyzed sugars separately, consuming them partially or totally after 24 h of incubation. Ethanol production was also verified for all strains grown in glucose and mannose, with emphasis on the 3.7 g.L⁻¹ produced by CHAP-130 from mannose, and 0.65 g.L⁻¹ from galactose. In the P&B experimental design, which contained different proportions of sugar mix, the superior performance of the wild strains CHAP-154 and CHAP-155 in relation to the industrial strains under the condition of the central points stands out, with a production of 3.2 and 4.4 g.L⁻¹ of ethanol and consumption of 33 and 40% of total reducing sugars, respectively. In addition, isolated macroalgae yeasts also demonstrated tolerance to NaCl and high temperatures. Thus, the data obtained suggest that the analyzed strains may contribute to the optimization of third-generation ethanol production.

Keywords: Ethanol 3G, Fermentation, Plackett & Burman, Mannose, Galactose.

1 INTRODUÇÃO

A demanda por combustíveis produzidos a partir de recursos renováveis aumentou nas últimas décadas especialmente em razão da crescente preocupação com os problemas ambientais gerados pela utilização de combustíveis fósseis (CRUZ et al., 2012). Por serem uma das únicas fontes de carbono alternativas às fontes fósseis, as biomassas oriundas de organismos fotossintetizantes ganharam destaque para substituição dos combustíveis de origem não renovável (RODRIGUES, 2011).

Ao longo desses anos houve diferentes períodos de incentivos para criação e expansão de indústrias destinadas à produção de bioetanol de primeira geração (1G), seja produzido pela fermentação do caldo da cana-de-açúcar ou do melaço derivado desse caldo, ricos em sacarose (VIGUIÉ et al., 2013), seja produzido a partir de materiais ricos em amido, como o milho (SAINI et al., 2015). Atualmente os EUA e o Brasil são os principais produtores de bioetanol,

obtido principalmente a partir do milho e da cana-de-açúcar, respectivamente, ambos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo fermentativo (RFA, 2019).

Em paralelo à produção já bem estabelecida de etanol 1G, ampliaram-se, nas últimas duas décadas, os investimentos em pesquisas que se propunham a viabilizar e a otimizar novas gerações deste combustível, tanto a partir de biomassa vegetal residual (etanol 2G) quanto de biomassas de macro e microalgas verdes, vermelhas ou marrons (etanol 3G). Contudo, embora a segunda geração já tenha sido amplamente estudada, a literatura carece de trabalhos voltados à otimização da produção do etanol de terceira geração, especialmente considerando a ampla variabilidade de carboidratos que podem ser disponibilizados a partir da hidrólise dos distintos polissacarídeos encontrados nas paredes celulares e nos vacúolos das algas (TRICHEZ et al., 2019).

As algas apresentam altas taxas de crescimento, fixação de CO₂ e elevado potencial de acúmulo de carboidratos (ALAM et al., 2015). Por serem amplamente distribuídas ao redor do globo, estão adaptadas a ambientes e climas bastante diversos, o que se reflete diretamente na sua biodiversidade e versatilidade (MIARA et al., 2014). Desse modo, podem ser cultivadas em águas residuais, água do mar e até mesmo no esgoto, garantindo, portanto, segurança hídrica durante a produção da biomassa algal, já que esta não requer o suprimento de água doce (ALASWAD et al., 2015; DARDA et al., 2019). Além disso, o cultivo de alga pode ocorrer durante todo o ano (em todas as estações), e uma vez que esses organismos dispõem de terras aráveis para cultivo, sua produção evita o emprego de pesticidas, herbicidas e fertilizantes (DARDA et al., 2019), representando, portanto, maior vantagem ambiental.

Apesar dos benefícios ao tratamento de efluentes e da contribuição para a fixação dos gases de efeito estufa (GEE), as algas podem causar problemas de eutrofização de corpos d'água, afetando, além dos próprios ecossistemas, setores da economia movidos pelo turismo. Logo, o desenvolvimento de tecnologias para utilização desse material e também de técnicas de pré-tratamento e hidrólise faz-se necessário para tornar o processo ecológico e economicamente viável (SOLIMAN et al., 2018).

Os carboidratos algais compreendem uma mistura de açúcares neutros, amino-açúcares e ácidos urônicos, e a composição depende da espécie e condições de crescimento. As algas verdes possuem composição diferenciada dos vegetais por conter polissacarídeos como ulvina e manana, além do amido e da celulose. As paredes celulares de algas vermelhas também possuem celulose, mas, além dela, carragenina, ágar e lignina. Já as algas marrons contêm laminarina, fucoidana e glucanocelulose. Os referidos polissacarídeos são majoritariamente constituídos de glicose, manose, manitol, alginato, galactose, ramnose, ácido glicurônico e

xilose (JOHN et al., 2011; JUNG et al., 2013; HARUN et al. 2014, VAREJÃO e NAZARÉ, 2017). Além disso, sua natureza flutuante reflete uma estrutura mais simples, com ausência ou baixo teor de lignina, o que facilita o pré-tratamento da biomassa algal e a hidrólise enzimática dos seus polissacarídeos para liberar os monossacarídeos a serem fermentados (BORINES et al., 2011; JOHN et al., 2011).

Embora *S. cerevisiae* seja uma levedura de referência na fermentação da glicose e também seja capaz de fermentar galactose (GOH e LEE, 2010), ela é incapaz de fermentar a maior parte dos carboidratos oriundos da biomassa de macroalgas, como manose, manitol, alginato, ramnose, ácido glicurônico e xilose (GREETHAM et al., 2018), o que inviabiliza a aplicação das cepas industriais atualmente disponíveis dessa espécie na etapa fermentativa da produção de etanol de terceira geração. Com intuito de melhorar a característica supracitada, microrganismos marinhos têm sido atualmente isolados, e características interessantes vem sendo neles observadas, especialmente em relação à tolerância osmótica e ao metabolismo de açúcares derivados de algas (ZAKY et al., 2014; 2018).

Portanto, frente ao cenário ambiental e econômico, a produção de bioetanol a partir de algas pode ser uma ótima alternativa às culturas alimentares e à dependência por combustíveis fósseis (KOLLER et al., 2012; ALAM et al., 2015). Haja vista os benefícios apresentados pela utilização de algas como fonte para produção de bioetanol, o presente estudo se propôs a analisar o desempenho fermentativo de cepas de leveduras isoladas de amostras de biomassa de algas verdes frente aos açúcares presentes nessas biomassas, podendo assim contribuir com a otimização da produção de etanol 3G.

2 METODOLOGIA

2.1 Leveduras utilizadas

Foram utilizadas cinco linhagens selvagens de leveduras do Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos, previamente isoladas de algas verdes em decomposição coletadas na praia dos Ingleses em Florianópolis/SC (CHAP-130, CHAP-133, CHAP-153, CHAP-154 e CHAP-155). Além das leveduras selvagens isoladas de algas verdes, foram analisadas também a linhagem industrial PE-2 (BASSO et al., 2008), da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, empregada na produção de etanol 1G, e a linhagem JDY-01 (DEOTI, 2017), modificada geneticamente a partir da PE-2 por meio de inserção de genes envolvidos no metabolismo da xilose – ambas cedidas pelo Dr. Boris U. Stambuk, do Depto.

de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2 Cultivo de leveduras em meios com açúcares isolados

Uma alçada de cada uma das linhagens foi inicialmente submetida a meios de cultura mínimos YNB (base nitrogenada de levedura a 0,67%) contendo, alternadamente, 2% de glicose, manose, galactose e xilose como fonte de carbono. Ao fim de 48 h de incubação, a capacidade de metabolizar os referidos carboidratos foi analisada pela medida da biomassa celular e pelo percentual de monossacarídeo consumido. A biomassa celular foi analisada por densidade óptica (DO) a 570 nm.

A quantificação de monossacarídeos consumidos (glicose, manose, galactose e xilose) durante os crescimentos celulares foi realizada através do método de DNS em microplacas desenvolvido por Santos et al. (2017).

A quantificação do etanol produzido durante os crescimentos foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; LCMS-2020, Shimadzu), com detector por índice de refração (RID-10A, Shimadzu) e coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87H Bio-Rad) nas seguintes condições: fase móvel com 5,0 mM de ácido sulfúrico, a 50 °C, com fluxo de 0,6 mL/min durante 25 minutos por amostra. As curvas de calibração foram aplicadas para todas as amostras analisadas, utilizando sete concentrações diferentes na faixa de 0,25 a 20,0 g/L para o etanol.

2.3 Cultivo de leveduras a partir de planejamento experimental de Plackett & Burman

Para o preparo do inóculo visando o crescimento celular de cada ensaio, as leveduras foram, inicialmente, pré-cultivadas em meio rico YP (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose) por 48 h.

Os meios de cultivo foram compostos de 0,67% de base nitrogenada de levedura (YNB) e concentrações distintas de carboidratos e NaCl, conforme matriz de delineamento experimental de Plackett & Burman apresentada na Tabela 1. Os meios tiveram seu pH ajustado em 3,0, 5,0 ou 7,0, e as fermentações foram conduzidas alternadamente em 3 diferentes temperaturas (20, 30 ou 40°C) durante 24 h, a 145 rpm, com retirada de amostras para análise da biomassa celular (DO_{570nm}), do consumo de açúcares e da produção de etanol ao fim das 24 h de incubação.

13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultivo de leveduras em meios com açúcares isolados

Inicialmente foram utilizadas cinco linhagens de leveduras selvagens para a análise de perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol em meios de cultivo contendo, alternadamente, 2% de glicose, manose, xilose e galactose. Todas as cepas foram capazes de metabolizar os açúcares disponibilizados.

O crescimento celular das cinco linhagens de leveduras a partir de meios com glicose e manose mostraram-se muito semelhantes (Figura 1A e 1C), assim como o consumo total dessas fontes de carbono em 24 h de cultivo (Figura 1B e 1D). Nesse sentido destaca-se a cepa CHAP-130, que apresentou produção de até 3,6 g.L⁻¹ de etanol a partir da glicose e 3,7 g.L⁻¹ de etanol a partir da manose (Figura 2), demonstrando um rendimento de aproximadamente 0,16 g.g⁻¹ para os dois carboidratos.

Com exceção da CHAP-155, os crescimentos celulares das demais cepas também se mostraram similares utilizando a galactose, porém com uma fase *lag* que durou em média 12 h (Figura 1F e 1H). A produção de etanol ocorreu apenas para as cepas CHAP-130 e CHAP-155, gerando, ao fim de 24 h de cultivo, aproximadamente 0,6 g.L⁻¹.

Nota-se que, mesmo com uma fase *lag* que também durou em média 12 h (até que iniciasse a fase exponencial de crescimento portanto), foi consumido em torno de 50% da xilose disponibilizada no caso da CHAP-154 e até 80% no cultivo da CHAP-155. No entanto, o metabolismo desse monossacarídeo se mostrou essencialmente respiratório, haja vista a ausência de produção de etanol a partir dessa fonte de carbono (Figura 2).

Assim sendo, o metabolismo da manose e xilose pelas linhagens de leveduras selvagens demonstram resultados positivos, uma vez que esses açúcares efetivamente foram metabolizados, o que não ocorre em *S. cerevisiae* (STAMBUK et al., 2008).

Figura 1– Perfis de crescimento celular (A, C, E, G) e consumo de açúcares (B, D, F, H) das linhagens CHAP-130 (●), CHAP-133 (■), CHAP-153 (◆), CHAP-154 (▲) e CHAP-155 (✕) em meios sintéticos mínimos contendo 2% de glicose (A, B), manose (C, D), xilose (E, F) e galactose (G, H).

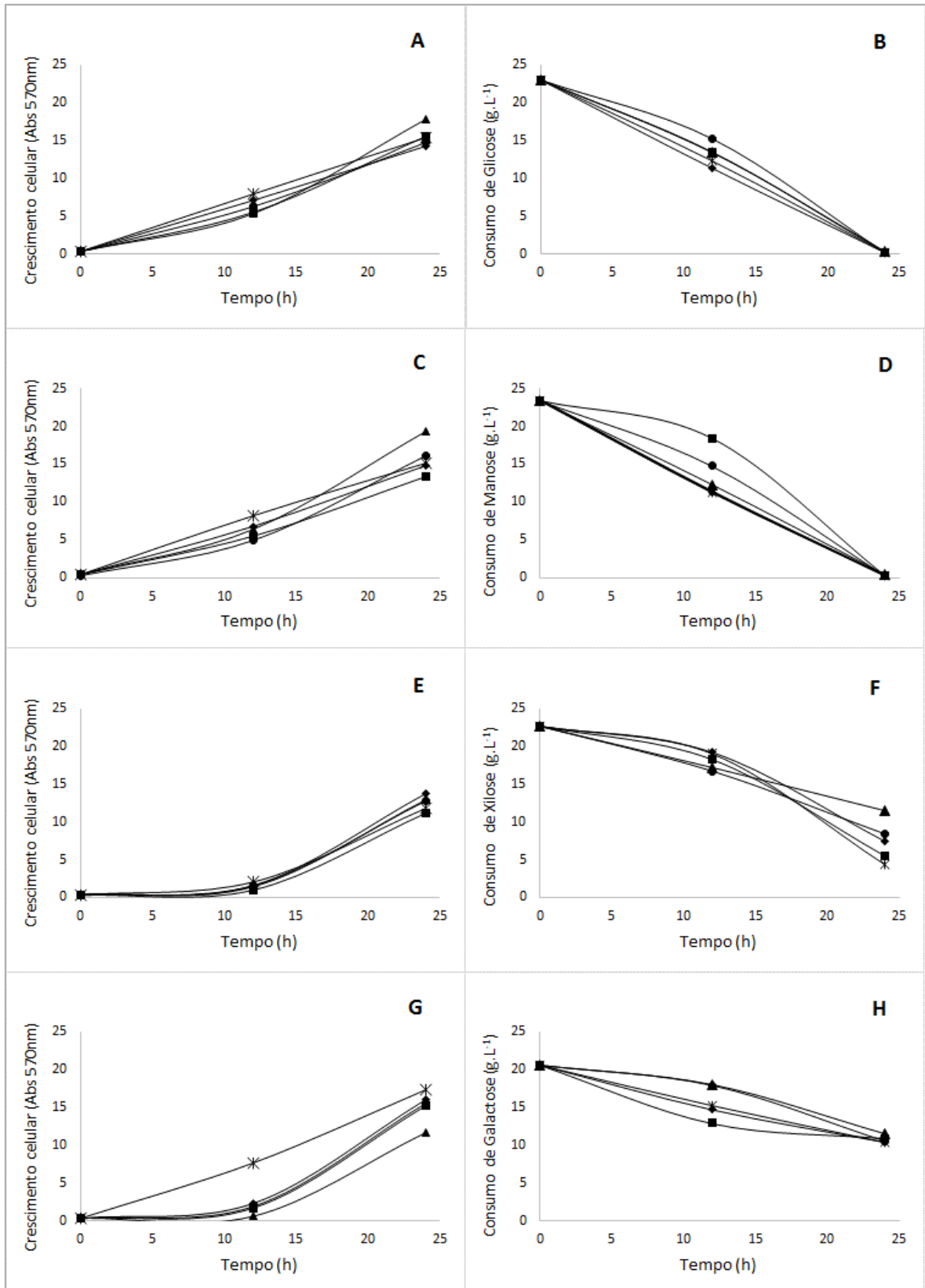
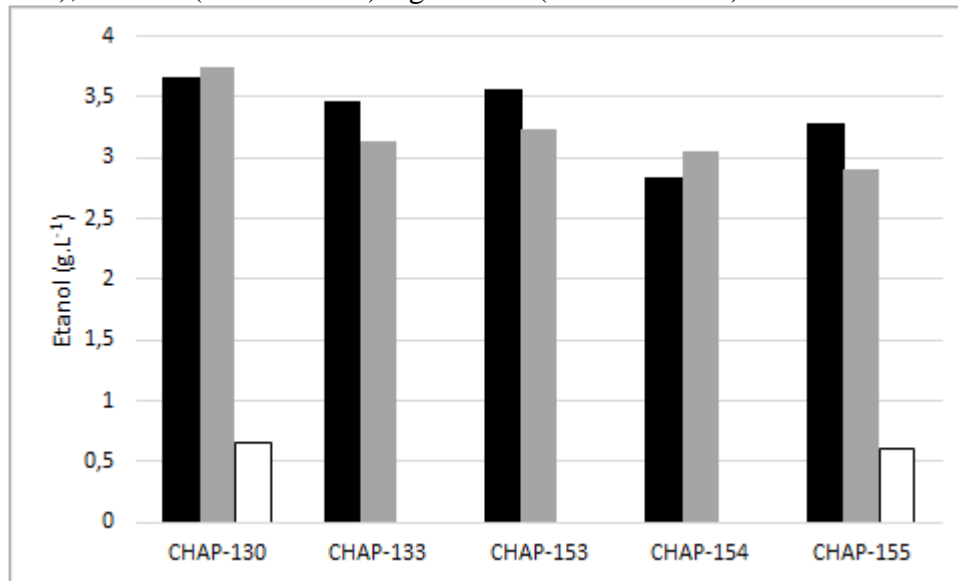


Figura 2– Produção de etanol pelas cinco linhagens de leveduras quando cultivadas em glicose (barras pretas), manose (barras cinzas) e galactose (barras brancas).



3.2 Cultivo de leveduras a partir de planejamento experimental de P&B

Objetivando comparar duas linhagens industriais de *S. cerevisiae* (PE-02 e JDY-01) com as cinco linhagens selvagens extraídas de algas em decomposição (CHAP-130, CHAP-133, CHAP-153, CHAP-154 e CHAP-155) em meios com misturas de açúcares em diferentes proporções, procedeu-se o planejamento experimental de Plackett & Burman (vide seção 2.3), sendo possível avaliar as cepas em 13 condições diferentes, com variação de oito parâmetros e possibilitando obter cinco respostas. Com isso, foram elaboradas as tabelas de 3 a 7 com os resultados para as cinco respostas geradas por cada uma das sete linhagens de leveduras analisadas. Foram também organizadas as figuras 3 a 7 com os gráficos de Pareto, que correspondem aos efeitos das variáveis sobre as cinco respostas para todas as sete cepas, considerando um nível de significância de 5%.

Observa-se na tabela 3 os resultados referentes a produção de biomassa para as sete linhagens analisadas. As cepas CHAP-130, CHAP-133, CHAP-153 produziram maior quantidade de biomassa nos ensaios 3, 4 e 12, que ocorreram a 20° C e sem adição de NaCl, o que pode ser ainda corroborado pelos gráficos de efeitos (figura 3A, 3B e 3C), que demonstram que quanto menor a concentração de sal melhor a produção de biomassa. No entanto, houve tolerância às condições dos pontos centrais (30°C e 17,5 g.L⁻¹ de NaCl), expressando produção de biomassa pouco menor que nos ensaios citados anteriormente. Isso se reflete também no fato de a curvatura ter apresentado valor t calculado significativo (figura 3A, 3B e 3C).

Tabela 3– Produção de biomassa, por sete linhagens de leveduras, após 24 h de cultivo. *

Ensaio	Linhagem						
	CHAP-130	CHAP-133	CHAP-153	CHAP-154	CHAP-155	JDY-01	PE-2
1	1,73	1,97	1,90	2,28	1,94	0,29	0,47
2	1,52	1,54	1,65	1,09	1,49	0,45	0,42
3	4,05	3,92	3,82	2,84	3,52	1,43	1,04
4	3,35	3,84	3,61	3,00	3,39	1,46	1,11
5	2,00	1,91	1,87	3,66	1,74	1,24	1,35
6	1,61	1,94	1,83	1,04	1,66	0,28	0,26
7	2,42	2,51	2,52	4,60	2,52	1,83	2,07
8	2,40	2,29	2,46	1,96	2,38	0,28	0,45
9	1,70	1,91	2,01	1,24	1,61	0,18	0,28
10	1,82	2,10	2,17	5,23	2,46	1,84	1,33
11	2,21	2,04	1,98	3,45	2,03	0,49	0,82
12	3,91	4,19	4,32	2,92	3,97	1,50	1,10
13	3,35	3,30	3,28	5,96	4,05	3,38	3,42
14	3,38	3,25	3,36	5,75	3,96	3,49	3,54
15	3,23	2,94	3,57	6,16	3,93	3,23	3,63

* Dados apresentados em g.L⁻¹

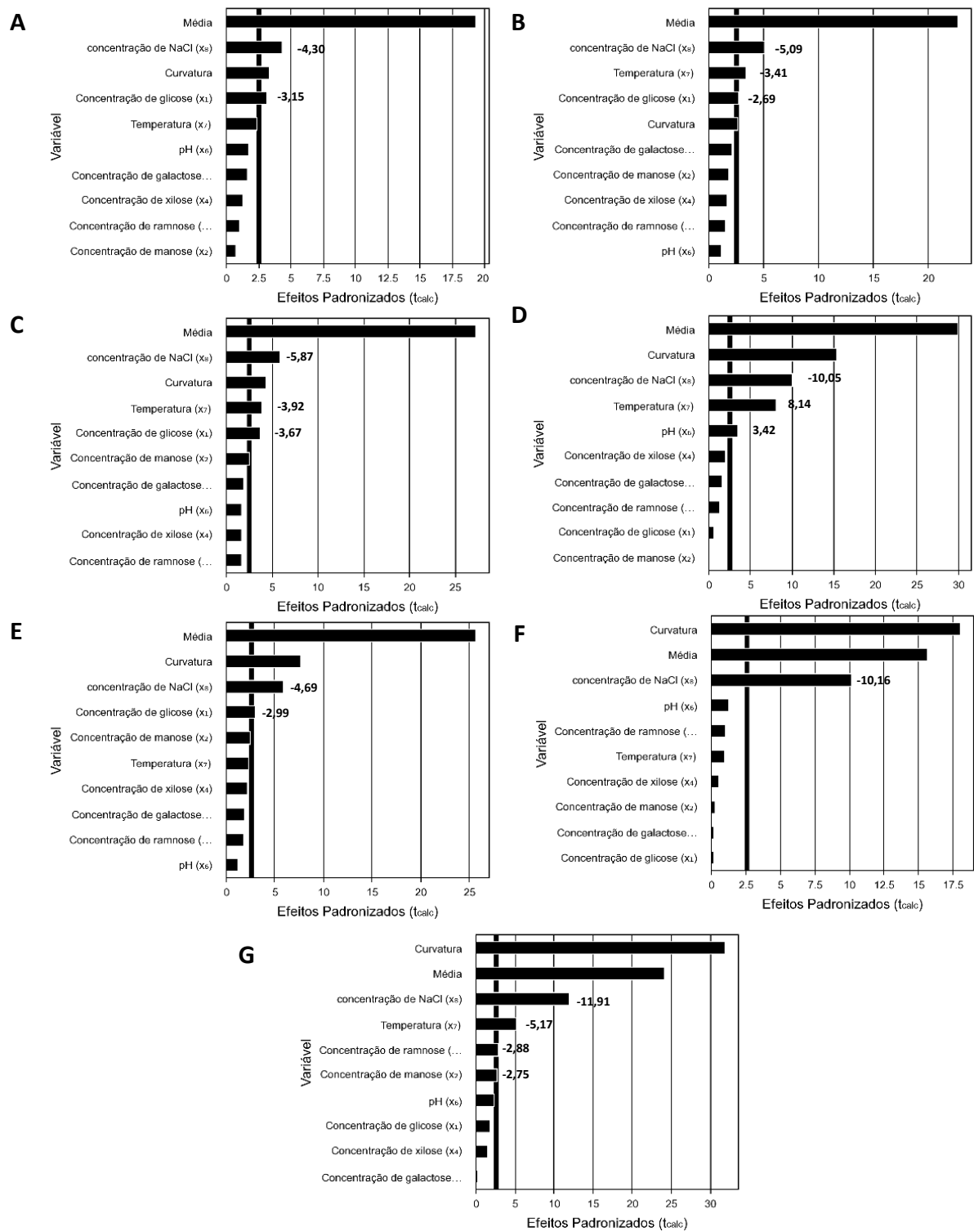
Já as cepas CHAP-154, CHAP-155, JDY-01 e PE-02, em relação às elevadas concentrações de biomassa e maiores rendimentos (Tabela 3 e 4), tiveram melhor desempenho nas condições dos pontos centrais, o que corrobora o fato de a curvatura ter tido efeito significativo mais elevado do que nas linhagens mencionadas no parágrafo anterior (Figura 3D, 3E, 3F e 3G). Entretanto, conforme pode ser visto na figura 7F e 7G, nas cepas JDY-01 e PE-2, o NaCl teve maior influência negativa, refletindo em menor consumo dos açúcares, em comparação às cepas CHAP-154 e CHAP-155. Consequentemente, o rendimento máximo de biomassa para as cepas JDY-01 e PE-2 mostrou-se similar ao das cepas CHAP-130, CHAP-133, CHAP-153 e inferior ao das cepas CHAP-154, CHAP-155 (Tabela 4).

Tabela 4– Rendimento de biomassa, por sete linhagens de leveduras, após 24 h de cultivo. *

Ensaio	Linhagem						
	CHAP-130	CHAP-133	CHAP-153	CHAP-154	CHAP-155	JDY-01	PE-2
1	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,01	0,01
2	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,00
3	0,06	0,06	0,06	0,04	0,05	0,02	0,02
4	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,02	0,02
5	0,03	0,02	0,02	0,05	0,02	0,02	0,02
6	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,00	0,00
7	0,04	0,04	0,04	0,07	0,04	0,03	0,03
8	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,00	0,01
9	0,03	0,04	0,04	0,02	0,03	0,00	0,01
10	0,04	0,05	0,05	0,11	0,05	0,04	0,03
11	0,07	0,06	0,06	0,10	0,06	0,02	0,03
12	0,17	0,18	0,19	0,13	0,17	0,07	0,05
13	0,06	0,06	0,06	0,11	0,07	0,06	0,06
14	0,06	0,06	0,06	0,10	0,07	0,06	0,06
15	0,06	0,05	0,07	0,11	0,07	0,06	0,07

* Dados apresentados em g.g⁻¹

Figura 3– Efeitos das variáveis testadas sobre a produção de biomassa para as linhagens CHAP-130 (A), CHAP-133 (B), CHAP-153 (C), CHAP-154 (D), CHAP-155 (E), JDY-01 (F) e PE-02 (G), considerando um nível de significância de 5%.



De fato, para todas as respostas analisadas, o efeito negativo do NaCl foi sempre mais pronunciado sobre as linhagens de *S. cerevisiae* do que sobre as linhagens selvagens isoladas de alga (vide figuras 3 a 7). Observa-se que, para as cepas JDY-01 e PE-2, o sal foi a variável que mais prejudicou o desempenho fermentativo (Tabela 5), o que especialmente se percebe ao serem comparados os ensaios 1, 2, 6, 8 e 9 com ensaios como o de número 7, em que não havia NaCl e foram gerados até 7,62 g.L⁻¹ de etanol. O efeito inibitório a altos teores de sal também foi encontrado por Khambhaty et al. (2013) ao avaliar uma cepa marinha de *Candida* sp. em hidrolisado de algas vermelhas que, embora não tenha apresentado bom desempenho fermentativo em concentrações de 11,25% de sal, na presença de 9–6,25% de sal, a conversão de açúcar em etanol foi de 100% com 1,76% de etanol produzido.

A influência da temperatura na produção de etanol das cepas CHAP-130, CHAP-133 e CHAP-153 foi positiva, representando melhor desempenho fermentativo quanto maior a temperatura de cultivo. Em outras palavras, a produção de etanol foi maior principalmente nos ensaios a 40°C (Tabela 5, ensaios 1, 5, 7, 10 e 11) não apresentando influência significativa do NaCl (Figuras 5A, 5B e 5C). De fato, o efeito positivo da temperatura já foi observado por outros autores: Borines et al. (2013) submeteram *S. cerevisiae* a um hidrolisado obtido do pré-tratamento com ácido diluído e sacarificação enzimática e verificaram que temperaturas mais altas favoreceram a fermentação do hidrolisado. Além do efeito positivo da temperatura, verifica-se ainda que, para a cepa industrial PE-2, houve efeito significativo positivo também da variável pH, indicando a preferência por faixas mais alcalinas, ao contrário do relatado por Borines et al. (2013).

Tabela 5– Produção de etanol, por sete linhagens de leveduras, após 24 h de cultivo. *

Ensaio	Linhagem						
	CHAP-130	CHAP-133	CHAP-153	CHAP-154	CHAP-155	JDY-01	PE-2
1	2,05	2,05	1,91	0	1,42	1,27	2,40
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,02	1,16
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,68	3,07
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,43	4,52
5	2,25	2,35	2,76	1,94	1,43	7,29	6,60
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,5	0,59
7	2,21	1,96	2,76	2,25	1,04	7,62	7,24
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	1,20
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57
10	3,03	2,74	2,55	2,45	1,59	7,41	7,09
11	2,91	3,01	2,21	1,98	1,98	4,16	4,83
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,23	2,37
13	1,60	2,47	2,06	3,74	3,20	3,92	5,08
14	1,64	2,31	2,47	4,40	3,72	5,17	5,19
15	1,79	2,27	2,75	4,44	3,88	4,86	4,80

* Dados apresentados em g.L⁻¹

Figura 4– Efeitos das variáveis testadas sobre o rendimento de biomassa para as linhagens CHAP-130 (A), CHAP-133 (B), CHAP-153 (C), CHAP-154 (D), CHAP-155 (E), JDY-01 (F) e PE-02 (G), considerando um nível de significância de 5%.

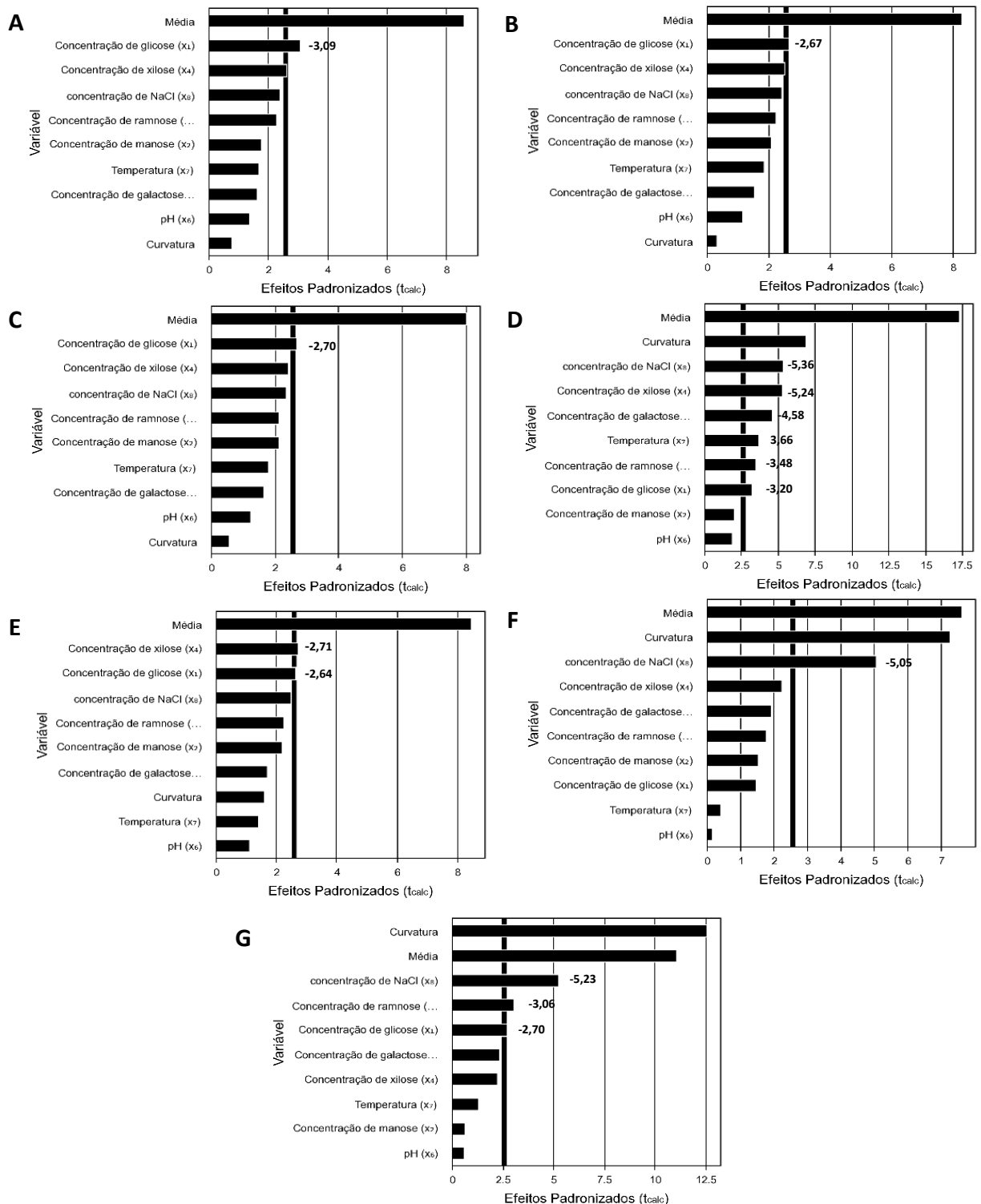


Figura 5– Efeitos das variáveis testadas sobre a produção de etanol para as linhagens CHAP-130 (A), CHAP-133 (B), CHAP-153 (C), CHAP-154 (D), CHAP-155 (E), JDY-01 (F) e PE-02 (G), considerando um nível de significância de 5%.

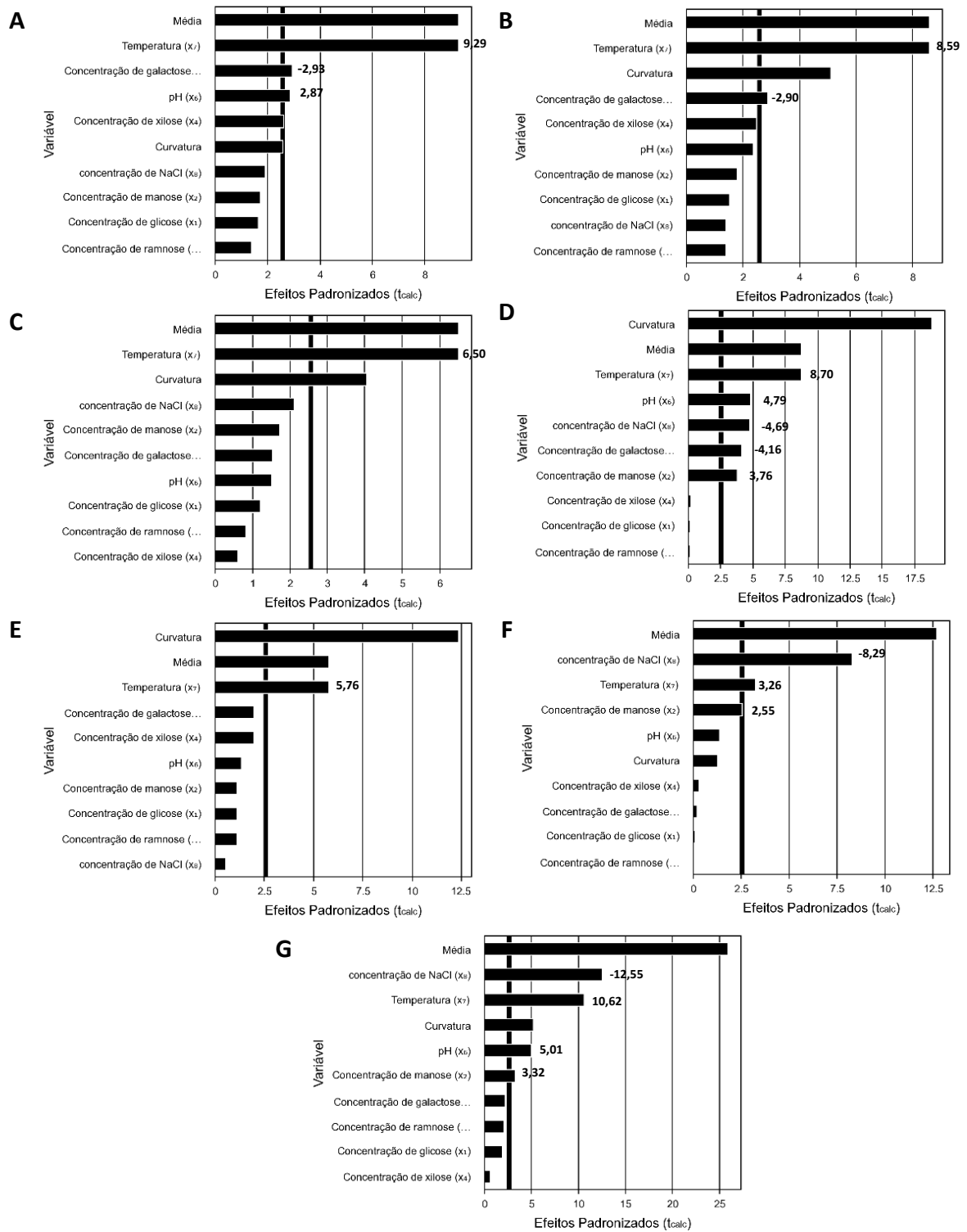


Figura 6– Efeitos das variáveis testadas sobre o rendimento de etanol para as linhagens CHAP-130 (A), CHAP-133 (B), CHAP-153 (C), CHAP-154 (D), CHAP-155 (E), JDY-01 (F) e PE-02 (G), considerando um nível de significância de 5%.

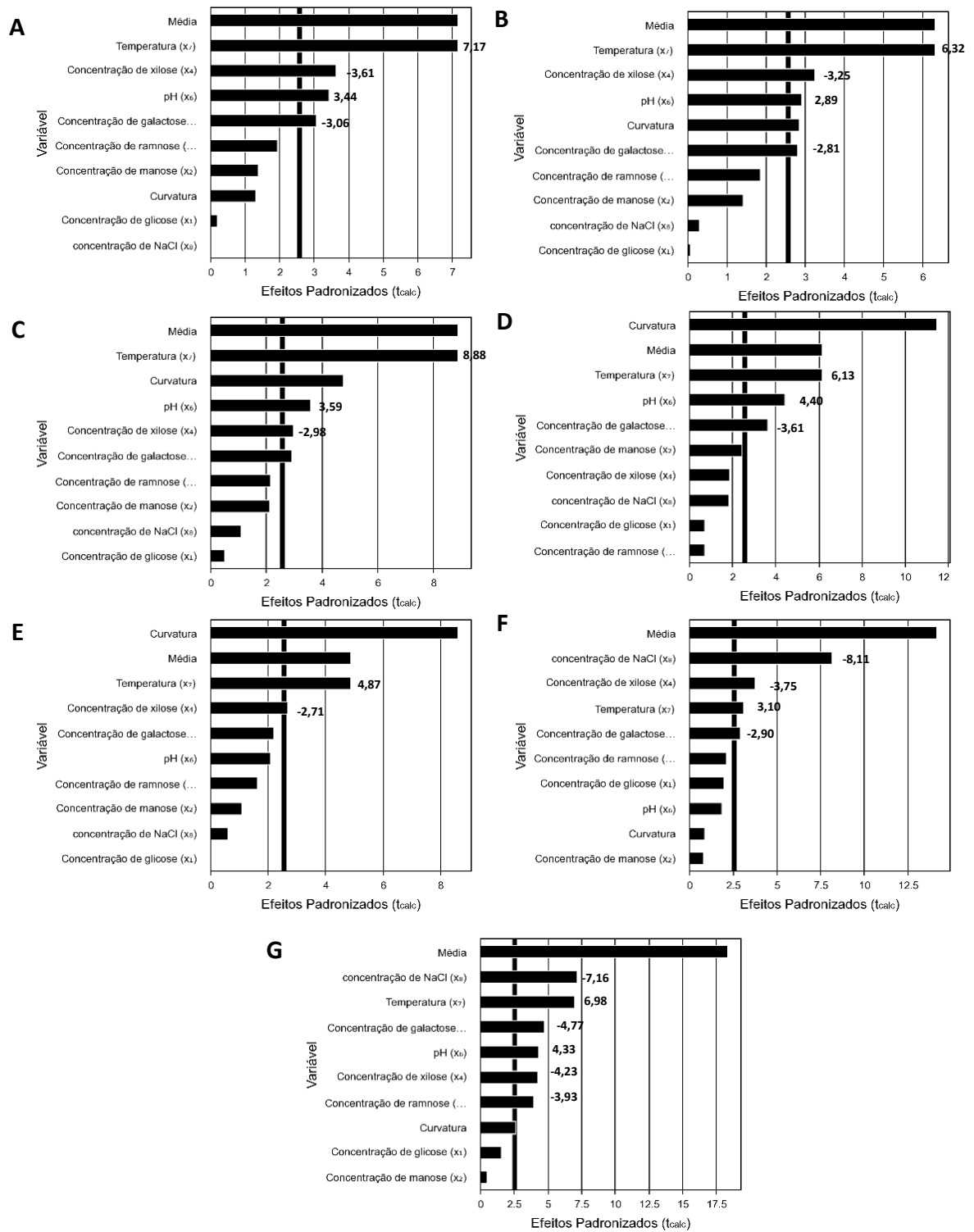
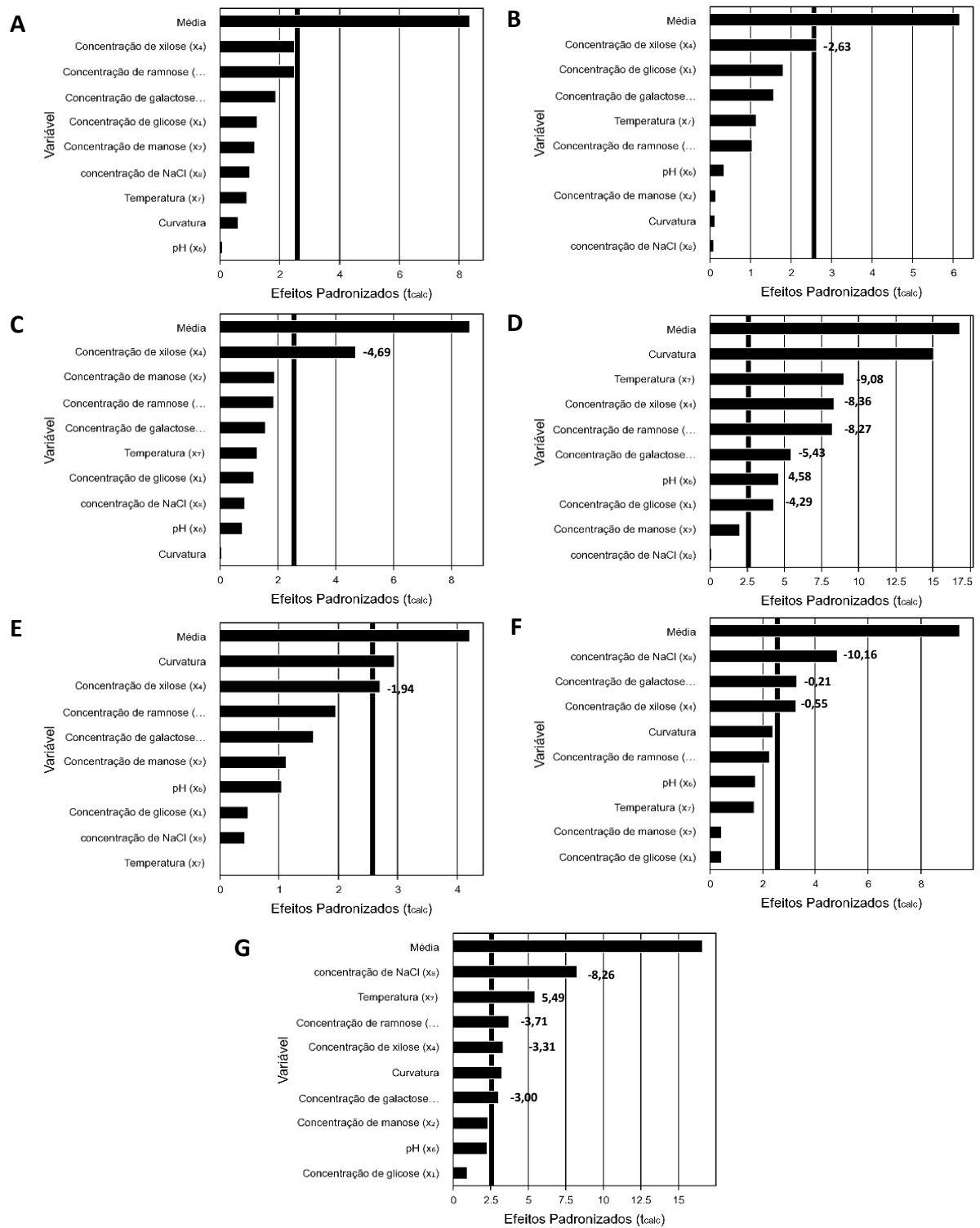


Figura 7– Efeitos das variáveis testadas sobre a porcentagem de ART consumido para as linhagens CHAP-130 (A), CHAP-133 (B), CHAP-153 (C), CHAP-154 (D), CHAP-155 (E), JDY-01 (F) e PE-02 (G), considerando um nível de significância de 5%.



As cepas CHAP-154 e CHAP-155, na condição dos pontos centrais, produziram 4,4 e 3,8 g.L⁻¹ de etanol, respectivamente (Tabela 5), resultados muito similares aos que as cepas de *S. cerevisiae* obtiveram nas mesmas condições. Além disso, os resultados de rendimentos de etanol dessas quatro cepas também se mostraram parecidos, com valores entre 0,06 e 0,09 g.g⁻¹ (Tabela 6). Vale ainda ressaltar que estas cepas selvagens consumiram 33 e 40% de açúcares (Tabela 7), respectivamente, gerando de 3,9 até 6,1 g.L⁻¹ de biomassa (Tabela 3), enquanto que a JDY-01 e a PE-2 utilizaram de 24 a 34% (Tabela 7) produzindo no máximo 3,6 g.L⁻¹ de biomassa (Tabela 3).

Tabela 6– Rendimento de etanol, por sete linhagens de leveduras, após 24 h de cultivo. *

Ensaio	Linhagem						
	CHAP-130	CHAP-133	CHAP-153	CHAP-154	CHAP-155	JDY-01	PE-2
1	0,04	0,04	0,04	0,00	0,03	0,02	0,05
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,05
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,07
5	0,03	0,03	0,04	0,03	0,02	0,09	0,09
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
7	0,04	0,03	0,04	0,04	0,02	0,12	0,12
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
10	0,07	0,06	0,06	0,05	0,03	0,16	0,16
11	0,09	0,09	0,07	0,06	0,06	0,13	0,15
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,10
13	0,03	0,04	0,04	0,07	0,06	0,07	0,09
14	0,03	0,04	0,04	0,08	0,07	0,09	0,09
15	0,03	0,04	0,05	0,08	0,07	0,08	0,09

* Dados apresentados em g.g⁻¹

Tabela 7– Percentual de ART consumida nos meios de cultivo, por sete linhagens de leveduras, após 24 h de cultivo.

Ensaio	Linhagem						
	CHAP-130	CHAP-133	CHAP-153	CHAP-154	CHAP-155	JDY-01	PE-2
1	21,73	28,91	31,53	15,33	24,76	6,85	14,47
2	13,50	3,62	0,95	3,88	4,23	6,65	7,55
3	14,02	24,88	17,66	3,72	3,73	13,38	23,21
4	13,75	4,67	6,99	2,25	6,06	20,99	19,99
5	8,16	16,02	10,10	4,88	11,04	19,68	28,00
6	11,91	8,06	5,07	1,86	9,83	5,98	0,00
7	17,64	15,91	7,82	17,64	1,63	24,04	36,54
8	1,58	4,93	3,18	1,65	1,52	0,00	0,00
9	18,36	22,01	11,37	1,25	2,90	0,00	0,01
10	18,98	21,55	21,81	18,51	11,62	43,77	38,06
11	24,22	51,51	27,38	38,32	25,16	33,98	35,80
12	43,55	32,17	32,97	16,16	49,37	42,56	26,25
13	24,35	32,92	19,85	33,62	40,78	24,25	24,24
14	9,09	18,09	11,59	29,81	29,75	26,39	31,42
15	9,79	9,85	11,98	30,85	26,71	34,16	27,03

Por conta disso, mais uma vez nota-se a influência da presença de sal ao cultivar linhagens de *S. cerevisiae* e a necessidade de caracterizar e utilizar novas leveduras selvagens, podendo empregá-las, através da engenharia genética, para melhorar essa característica das cepas industriais. Essa otimização tem sido extremamente desejável para diminuir o uso de água doce no processo de produção de etanol e, com isso, diminuir o que se conhece por pegada hídrica (CAMARGO et al., 2019; TRICHEZ et al., 2019).

Pesquisas recentes demonstraram o grande potencial da cepa marinha AZ65, da própria espécie *S. cerevisiae*, em fermentações contendo até 25% de glicose em meio confeccionado com água do mar (ZAKY et al., 2018). Contudo, sabe-se da preferência pelo consumo da glicose por leveduras (GAO et al., 2019), mas o desejável é que as linhagens selecionadas possam fermentar não somente a referida hexose, mas também outros açúcares presentes na biomassa de algas, característica que pode ser melhorada por expressão heteróloga de genes oriundos de cepas de leveduras aptas a metabolizar tais açúcares (GREETHAM et al. 2018, TRICHEZ et al., 2019), como as apresentadas no nosso trabalho.

4 CONCLUSÃO

Todas as cepas de leveduras selvagens testadas foram capazes de metabolizar glicose, manose, xilose e galactose separadamente, tendo a linhagem CHAP-130 sido capaz de produzir até 3,7 g.L⁻¹ de etanol a partir de manose. O presente estudo também revela que essas leveduras, adaptadas a ambiente salino, se sobressaem sobre as duas cepas de *S. cerevisiae* em características como a tolerância ao NaCl, consumo de açúcares e produção de biomassa celular frente a monossacarídeos presentes em hidrolisados de macroalgas. Além disso, nas condições dos pontos centrais, CHAP-154 e CHAP-155 exibiram rendimento de etanol similar ao encontrado para as cepas PE-2 e JDY-01.

Dessa forma, nossos resultados sugerem que as linhagens obtidas de algas podem contribuir para a otimização da produção de etanol 3G através do fornecimento de genes para expressão heteróloga em leveduras industriais, com vistas a melhorar as características destas últimas diante dos hidrolisados de biomassa algal, em face da perspectiva de aumento da segurança alimentar e da redução da pegada hídrica do processo.

5 REFERÊNCIAS

- ALAM, F.; MOBIN, S.; CHOWDHURY, H. (2015) Third Generation Biofuel from Algae. *Procedia Engineering*, 105: 763-768.
- ALASWAD, A.; DASSISTI, M.; PRESCOTT, T.; OLABI, A.G. (2015). Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51: 1446-1460.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res* 8: 1155-1163.
- BORINES, M.G.; LEON, R.L.; CUELLO, J.L. (2013) Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp. *Bioresource Technology*, 138: 22-29.
- CRUZ, M.G.; GUERREIRO, E.; RAIHER, A.P. (2012) A evolução da produção de etanol no Brasil, no período de 1975 a 2009. *Documentos Técnicos-Científicos*, 43:141-159.
- DARDA, S.; PAPALAS, T.; ZABANIOTOU, A. (2019) Biofuels journey in Europe: currently the way to low carbon economy sustainability is still a challenge. *Journal of Cleaner Production*, 208: 575-588.
- DEOTI, J. R. Avaliação da tolerância a ácidos carboxílicos inibidores de fermentação por leveduras assimiladoras de pentoses. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.
- GOH, C. S.; LEE, K. T. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2010, 14, 842–848.
- GREETHAM, D.; ZAKY, A.; MAKANJUOLA, O.; DU, C. (2018) A Brief review on bioethanol production using marine biomass, marine microorganism and seawater. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14: 53-59.
- HARUN, R.; YIP, J. W. S.; THIRUVENKADAM, S.; GHANI, W. A. W. A. K.; CHERRINGTON, T.; & DANQUAH, M. K. (2013). Algal biomass conversion to bioethanol - a step-by-step assessment. *Biotechnology Journal*, 9(1), 73–86. doi:10.1002/biot.201200353
- JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102: 186-193.
- JUNG, K. A.; LIM, S.-R.; KIM, Y.; & PARK, J. M. (2013). *Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. Bioresource Technology*, 135, 182–190. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.025
- KHAMBHATY, Y.; UPADHYAY, D.; KRIPLANI, Y.; JOSHI, N.; MODY, K.; & GANDHI, M. R. (2013). Bioethanol from Macroalgal Biomass: Utilization of Marine Yeast for Production of the Same. *BioEnergy Research*, 6(1), 188–195. doi:10.1007/s12155-012-9249-4
- KOLLER, M.; SALERNO A, TUFFNER P, KOINIGG M, BÖCHZELT H, SCHOBER S, et al. Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: A review. *J Clean Prod.* 2012;37:377–88.

- MIARA, A.; PIENKOS, P.T.; BAZILIAN, M.; DAVIS, R.; MACKNICK, J. (2014) Planning for algal systems: an energy-water-food nexus perspective. *Industrial Biotechnology*, 10: 202-211.
- MIARA, A.; PIENKOS, P.T.; BAZILIAN, M.; DAVIS, R.; MACKNICK, J. (2014) Planning for algal systems: an energy-water-food nexus perspective. *Industrial Biotechnology*, 10: 202-211.
- RFA - Renewable Fuels Association (2019) World fuel ethanol production. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>.
- RODRIGUES, J. A. R. Do engenho a Biorrefinaria, usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. *Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1242-1254, 2011.
- SAINI, J.K.; SAINI, R.; TEWARI, L. (2015) Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5:337-353.
- SANTOS, A.A.; DEOTI, J.R.; MÜLLER, G., DÁRIO, M.G.; STAMBUK, B.U.; JÚNIOR, S.L.A. (2017) Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20:e2015113.
- SOLIMAN, R. M.; YOUNIS, S. A.; EL-GENDY, N. S.; MOSTAFA, S. S. M.; EL-TEMAMY, S. A.; & HASHIM, A. I. (2018). Batch bioethanol production via the biological and chemical saccharification of some Egyptian marine macroalgae. *Journal of Applied Microbiology*, 125(2), 422–440. doi:10.1111/jam.13886
- STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A.; FLOREZ-PARDO, L.M.; SOUTO-MAIOR, A.M.; BOM, E.P.S. (2008) Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. *J. Sci. Ind. Res.* 67: 918-926.
- TRICHEZ, D.; BERGMANN, J.C.; CALSING, L.C.G.; CANÇADO, L.J. (2019) How many bioethanol generations can we have? In *Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives*, edited by TREICHEL H, ALVES SL Jr, FONGARO G, MÜLLER C, *in press*, Nova Science Publishers: Hauppauge, NY.
- VAREJÃO JMTB, NAZARÉ R (2017) Ethanol production from macroalgae biomass. In *Algal Biofuels*, edited by PEREIRA L, 189-200. CRC Press: Boca Raton, FL.
- VIGUIÉ, J.C.; ULLRICH, N.; PORAT, P.; BOURNAY, L.; HECQUET, M.; ROUSSEAU, J. (2013) BioTfuel Project: Targeting the development of second-generation biodiesel and biojet fuels. *Oil & Gas Science and Technology*, 68:935-946
- ZAKY, A.S.; GREETHAM, D.; TUCKER, G.A.; DU, C. (2018) The establishment of a marine focused biorefinery for bioethanol production using seawater and a novel marine yeast strain. *Sci Rep.* 8: 12127.
- ZAKY, A.S.; TUCKER, G.A.; DAW, Z.Y.; DU, C. (2014) Marine yeast isolation and industrial application. *FEMS Yeast Res.* 14: 813-825.